



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND

DEUTSCHES
PATENTAMT



(12) **Patentschrift**
(10) **DE 195 43 039 C 1**

(51) Int. Cl. 6:
C 12 N 15/79
C 12 N 15/70
C 12 N 15/74
C 12 N 15/11
C 12 N 5/10
C 12 N 1/00
C 12 N 1/21
C 07 K 16/18
G 01 N 33/53
G 01 N 33/574
A 61 K 39/395

DE 195 43 039 C 1

(21) Aktenzeichen: 195 43 039.5-41
(22) Anmeldetag: 8. 11. 95
(43) Offenlegungstag: —
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 21. 11. 96

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

(73) Patentinhaber:
Medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate
mbH, 20354 Hamburg, DE

(74) Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

(72) Erfinder:
Ziegler, Andreas, Prof. Dr., 14050 Berlin, DE; Stein,
Harald, Prof. Dr., 14195 Berlin, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
WO 94 04 189

(54) Rekombinante Liganden für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige rekombinante DNA-Moleküle oder Teile derselben, welche für variable Immunglobulinketten oder Fragmente davon kodieren, die Spezifität für das menschliche Zellmembranmolekül CD30 aufweisen. Ferner werden Expressionsvektoren, die diese DNA-Moleküle enthalten, sowie damit transformierte Wirtszellen bereitgestellt, die in der Lage sind, die neuartigen Liganden zu produzieren. Darüber hinaus werden ein Verfahren zur Herstellung von Liganden der bezeichneten Spezifität unter Verwendung der transformierten Wirtszellen, die daraus resultierenden Liganden sowie diese enthaltende diagnostische und pharmazeutische Präparate beschrieben.

DE 195 43 039 C 1



Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige rekombinante DNA-Moleküle, welche für variable Immunglobulinketten oder Fragmente derselben kodieren, die Spezifität für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 aufweisen. Die Erfindung betrifft ferner Expressionsvektoren, die diese DNA-Moleküle enthalten, sowie damit transformierte Wirtszellen, die in der Lage sind, die neuartigen Liganden zu produzieren. Darüber hinaus werden ein Verfahren zur Herstellung von Liganden der bezeichneten Spezifität unter Verwendung der transformierten Wirtszellen, die daraus resultierenden Liganden sowie diese enthaltende diagnostische und pharmazeutische Präparate bereitgestellt.

Das CD30-Antigen ist ein Glykoprotein mit einer Molekulmasse von 120 kD, wenn diese durch eine SDS-Elektrophorese bestimmt wird. Das besondere an dem CD30-Antigen ist, daß es normalerweise im Organismus nur auf sehr wenigen aktivierten T-Zell- und B-Zell-Blasten und an diesen auch nur in geringer Dichte vorhanden ist (Stein et al., "Identification of Hodgkin and Sternberg-Reed cells as a unique cell type derived from a newly detected small cell population", Int. J. Cancer, 30, S. 445–459, 1982; Stein et al., "The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells", Blood, 66, S. 848–858, 1985; Schwarting et al., "Ber-H2: a new monoclonal antibody of the Ki-1 family for the detection of Hodgkin's disease in formaldehyde-fixed tissue sections (A2.13)", in: Leucocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens, A.J. McMichael, Hrsg., Oxford University Press, Oxford – New York – Tokyo, S. 574–575, 1987), während es aber bei einer Reihe von lymphoproliferativen Prozessen und bei embryonalen Karzinomen in sehr viel höherer Konzentration exprimiert wird. Zu den stark CD30-positiven malignen Lymphomen gehören in erster Linie die Hodgkin-Lymphome, das anaplastische großzellige Lymphom wie auch die akute Form der adulten T-Zell-Leukämie.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß das CD30-Molekül selektiv von aktivierten Th2-Blasten (S. Romagnani, "Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the 'natural' immune response?", Immunol. Today, 13, S. 379–381, 1992) in vitro und in vivo exprimiert wird (Del Prete et al., "CD30, Th2 cytokines and HIV infection: a complex and fascinating link", Immunol. Today, 16(2): 76–80, 1995). Bei Patienten mit allergischen Erkrankungen war die Zahl der CD30⁺ Th2-Blasten im Vergleich zu Normalpersonen um ein Vielfaches erhöht. Es ist daher denkbar, daß die Mehrzahl der Autoaggressionserkrankungen auf eine Fehlsteuerung der Th2-Antwort mit Vermehrung von Th2-Zellen zurückzuführen ist.

Wegen des äußerst seltenen Vorkommens des CD30-Moleküls im normalen Organismus und der hohen Expression dieses Moleküls auf den Tumorzellen der oben genannten Lymphome und des embryonalen Karzinoms sowie auf aktivierten Th2-Blasten sind eine auf die Expression des CD30-Moleküls aufbauende Diagnostik und Therapie eine wichtige Strategie zur Erkennung und Behandlung der genannten Erkrankungen.

Es sind bereits Immunotoxine versuchsweise in vivo beim Menschen angewendet worden, mit denen Hodgkin-Lymphomzellen erkannt bzw. eliminiert werden können (B. Falini et al., "Response of refractory Hodgkin's disease to monoclonal anti-CD30 immunotoxin", Lancet, 339, S. 1195–1196, 1992; Falini et al., "In vivo targeting of Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with monoclonal antibody Ber-H2 (CD30): Immunohistological evidence", Brit. J. Haematol., 82, S. 38–45, 1992).

Die primäre Diagnostik der CD30-positiven Krebsformen wird gegenwärtig immunhistologisch durchgeführt, wobei als Antikörper z.Z. ausschließlich Reagenzien der Maus wie z. B. Ber-H2 eingesetzt werden. Bei diesem Reagenz handelt es sich um einen gegen das CD30-Molekül gerichteten monoklonalen Antikörper, der 1987 in einem Kurzbeitrag und 1989 in ausführlicher Weise von der Arbeitsgruppe der Erfinder beschrieben wurde (Schwarting et al., "Ber-H2: a new anti-Ki-1 (CD30) monoclonal antibody directed at a formalin-resistant epitope", Blood, 74, S. 1678–1689, 1989). Dieser Antikörper wird von der gleichnamigen Maus-Myelom-Hybridzelllinie sezerniert, die am 28.01.1992 bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Public Health Laboratories Service Board, 61 Collindale Avenue, London, NW9 5DF, nach den Bestimmungen des Budapest Vertrages unter der Hinterlegungsnummer Ber-H2 92012823 hinterlegt worden ist. Allerdings ist es bei der Massenproduktion dieses Antikörpers in Langzeitkultur (etwa in Fermentern) von erheblichem Nachteil, daß die Antikörperproduzierenden Zellen bereits nach einigen Generationen von solchen Zellen überwachsen werden, die die Fähigkeit zur Antikörperproduktion verloren haben, offenbar weil letztere nicht mehr in der Lage sind, schwere Immunglobulinketten oder auch schwere und leichte Immunglobulinketten zu synthetisieren.

Die Ausbreitungsdiagnostik der genannten Tumorerkrankungen erfolgt in der Regel durch Computertomographie, Sonographie und/oder Lymphographie. Die genannte nicht-invasive Ausbreitungsdiagnostik ist jedoch mit dem Nachteil verbunden, daß lediglich relativ große Tumormassen identifiziert werden können, kleinere Tumore oder Metastasen jedoch nicht nachweisbar sind. Die deshalb oft zusätzlich angewendete chirurgische Ausbreitungsdiagnostik ist für den Patienten sehr belastend und auf bestimmte Körperhöhlen (z. B. Bauchhöhle) beschränkt. Die gegenwärtig medizinisch ausschließlich akzeptierte und deswegen angewandte Standardtherapie der CD30-positiven Tumore erfolgt mit einer unspezifischen Radio- und/oder Chemotherapie. Obgleich die Erfolgsrate ca. 60–70% beträgt, gibt es für die Therapieversager bisher kein kuratives Konzept.

Deshalb wurde der monoklonale Antikörper Ber-H2 mit pflanzlichen Giften konjugiert und versuchsweise zur Therapie von Patienten mit Morbus Hodgkins in terminaler Krankheitsphase eingesetzt (Falini et al., "Response of refractory Hodgkin's disease to monoclonal anti-CD30 immunotoxin", Lancet, 339, S. 1195–1196, 1992). Dabei zeigten die vier behandelten Patienten innerhalb von 10 Tagen eine Tumormassenreduktion um 50% bis nahezu 100%. Allerdings kam es in allen Fällen nach unterschiedlicher Zeit zum Neuauftreten von Tumormassen an den alten und/oder neuen Lokalisationen. Eine Wiederholung der Immunotoxinapplikation war nicht möglich, weil die so behandelten Patienten ausnahmslos Antikörper gegen den Maus-Antikörper Ber-H2 gebildet hatten.

Die immunologisch begründete Problematik der in-vivo-Applikation von Maus-Antikörpern gegen das



CD30-Molekül für diagnostische und therapeutische Zwecke läßt sich drastisch reduzieren, wenn anstelle des Maus-Antikörpers ein nicht oder nur geringfügig immunogenes Protein mit Spezifität für das CD30-Antigen eingesetzt wird.

Es besteht heute die Möglichkeit, die variablen Regionen von schwerer (V_H) und leichter (V_L) Kette eines Maus-Antikörpers an die entsprechenden konstanten Regionen C_H und C_L eines menschlichen Antikörpermoleküls anzufügen. Durch diese Manipulation werden die für den Menschen immunogenen Bereiche des Antikörper-Moleküls weitgehend beseitigt, während die Spezifität des ursprünglichen Maus-Antikörpers in dem chimären Molekül zumeist erhalten bleibt.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt daher in der Bereitstellung von neuen CD30-spezifischen Substanzen mit verminderter Immunogenität. Ferner soll die Instabilität der Zelllinie Ber-H2 in Bezug auf die Produktion des monoklonalen Antikörpers verbessert werden.

Zur Lösung der gestellten Aufgabe werden erfundungsgemäß die Gegenstände der Ansprüche 1, 6, 9, 13, 15, 25 und 26 vorgeschlagen, wobei bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung in den jeweiligen Unteransprüchen angegeben sind.

Erfundungsgemäß werden somit rekombinante DNA-Moleküle bereitgestellt, welche für variable Immunglobulinketten oder Fragmente derselben kodieren, die Spezifität für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 aufweisen, wobei die rekombinanten DNA-Moleküle Sequenzen gemäß einer oder mehrerer der SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und/oder 6 oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben umfassen, die vorzugsweise vollständig oder teilweise operativ miteinander verknüpft sind. Ferner ist es bevorzugt, daß diese Sequenzen oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben operativ mit DNA-Sequenzen verknüpft sind, die für konstante Teile eines humanen oder tierischen Immunglobulinmoleküls kodieren.

Nach einer weiteren Ausführungsform umfassen die rekombinanten DNA-Moleküle jeweils einen oder mehrere der hypervariablen Bereiche (die auch als CDR für "complementarity determining residues" bezeichnet werden) der in den SEQ ID NOS: 1 oder 3 bzw. in den SEQ ID NOS: 4 oder 6 angegebenen Sequenzen oder syngene oder allelische Varianten derselben.

Schließlich können die in den SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und/oder 6 angegebenen Sequenzen oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben operativ mit DNA-Sequenzen verknüpft sein, die für toxische Proteine oder Enzyme kodieren.

Ferner werden erfundungsgemäß Expressionsvektoren bereitgestellt, die ein oder mehrere der genannten rekombinanten DNA-Moleküle in operativer Verknüpfung mit Expressionskontroll-Sequenzen enthalten und vorzugsweise für die Expression in Prokaryonten- und/oder Eukaryonten-Wirtszellen geeignet sind.

Weiterhin stellt die Erfindung Wirtszellen zur Verfügung, die mit den genannten Expressionsvektoren transfiziert sind, wobei Prokaryonten- oder Eukaryonten-Zellen in Betracht kommen, wobei die bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) am 8. August 1995 unter der Zugriffssnummer DSM ACC2224 nach den Bestimmungen des Budapest Vertrages hinterlegte Eukaryonten-Zelle CH-BerH2 bevorzugt ist.

Im übrigen wird ein Verfahren zur Herstellung von Liganden für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 bereitgestellt, bei dem man eine der genannten Wirtszellen in einem geeigneten Nährmedium kultiviert, anschließend die Zellen von dem Medium abtrennt und die Liganden als Expressionsprodukte aus dem Medium oder aus dem Cytoplasma der Wirtszellen isoliert. Vorzugsweise werden die Liganden anschließend gereinigt und mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen zu pharmazeutischen oder diagnostischen Präparaten formuliert.

Ferner werden rekombinante Liganden für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 bereitgestellt, die mindestens die in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen oder Fragmente oder allelische Varianten derselben umfassen. Vorzugsweise umfassen diese Liganden jeweils einen oder mehrere der hypervariablen CDR-Bereiche der in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen oder syngene oder allelische Varianten derselben. Nach einer besonderen Ausführungsform sind in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebene Aminosäuresequenzen oder Fragmente oder allelische Varianten derselben untereinander verknüpft. Ferner können diese Sequenzen oder Fragmente oder allelische Varianten derselben vorzugsweise mit konstanten Teilen eines humanen oder tierischen Immunglobulinmoleküls verknüpft sein. Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die vorstehend genannten rekombinanten Liganden peptidisch oder über Linker-Moleküle mit toxischen Proteinen oder mit Enzymen bzw. Proenzymen verknüpft, wobei die Toxine vorzugsweise in Form von Ribosomen-inaktivierenden Proteinen vorliegen und die Enzyme vorzugsweise aus der Gruppe der Phosphodiesterasen ausgewählt sind. Nach einer alternativen Ausführungsform sind die vorstehend genannten rekombinanten Liganden direkt oder über Linker-Moleküle kovalent oder konjugiert mit photoaktivierbaren Verbindungen oder mit radioaktiven Isotopen verknüpft, wobei letztere vorzugsweise aus der Gruppe bestehend aus Indium, Jod, Yttrium, Technetium, Rhenium, Kupfer und Lutetium ausgewählt sind. Die Verknüpfung kann beispielsweise unter Verwendung von Chelatbildnern oder über photochemische Aktivierungsprozesse erfolgen (vgl. WO 94/04189).

Schließlich werden diagnostische oder pharmazeutische Präparate bereitgestellt, die vorzugsweise einen oder mehrere der vorstehend genannten oder durch das erfundungsgemäße Verfahren hergestellte Liganden allein oder in Kombination mit üblichen Trägerstoffen und Verdünnungsmitteln enthalten. Diese Präparate dienen vorzugsweise der Diagnostik und/oder Behandlung von Krebsformen wie insbesondere der Hodgkinischen Erkrankung, bei denen das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 auf Zellen exprimiert wird, die für die Erkrankung von Bedeutung sind.

Zur Lösung des der Erfindung zugrunde liegenden Problems wurden ausgehend von dem Maus-Antikörper Ber-H2 die Sequenzen der variablen Region der leichten (V_{LJ}) und schweren Ketten (V_{HDJ}) dieses CD30-reaktiven monoklonalen Antikörpers bestimmt. Die zugehörigen genomischen Sequenzen wurden dann mit den Sequenzen für die konstanten Regionen eines menschlichen Immunglobulinmoleküls verbunden. Das resultie-



rende Konstrukt wurde in einer geeigneten Zelle, vorzugsweise einer keine eigenen Immunglobulinketten produzierenden Myelomzelllinie, zur Expression gebracht.

Erfnungsgemäß wurde zunächst die zytoplasmatische RNA aus kultivierten, den Antikörper Ber-H2 produzierenden Zellen der Mausmyelomhybridlinie isoliert. Anschließend wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase eine cDNA-Synthese von V_{LJ} und V_{HDJ} durchgeführt, wobei die verwendeten, nachfolgend angegebenen Oligonukleotide dem 5'-Ende der konstanten Regionen der L- bzw. H-Kette komplementär waren:

10 5' AGATGGATAACAGTTGGT 3' (konL1)
 5' GGGGCCAGTGGA TAGAC 3' (konH1)

15 Um die cDNAs durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifizieren zu können, wurden sie mit Guanosin-Trinukleotiden so verlängert, daß ein Poly-C-Anker-oligo mit der nachfolgend angegebenen Sequenz als 5'-Primer dienen konnte:

5' GCGCGGCCGCGGAGGC CCCCCCOC CCCCCCCC 3' (AN-Poly-C).

20 Als 3'-Primer wurden die bereits zur cDNA-Synthese verwendeten Oligonukleotide konL1 bzw. konH1 eingesetzt. In weiteren PCR-Reaktionen wurden die cDNAs mit den nachfolgend angegebenen 3'-Oligonukleotiden konL2 bzw. konH2 sowie mit dem angegebenen Ankerprimer am 5'-Ende, die jeweils überhängende Restriktionschnittstellen trugen, amplifiziert:

25 5' GGAATTCTGGATAACAGTTGGTGCAGC 3' (konL2)
 5' GGAATTCTGTGGATAGACAGATGGG 3' (konH2)
 5' GCGCGGCCGCGGAGG 3' (Ankerprimer)
 30

Zur Bestimmung der cDNA-Sequenzen wurden die erhaltenen Fragmente in handelsübliche Sequenzierungsvektoren kloniert (z. B. unter Verwendung des Vektors pGEM®.11zf(+) von Promega, Heidelberg).

35 Die Sequenzanalysen ergaben, daß das V-Gensegment der leichten Kette des mAk Ber-H2 mit dem J₂-Gensegment, das der schweren Kette mit dem J₃-Gensegment rekombiniert war.

Mit Hilfe dieser cDNA-Sequenzen konnten in einem weiteren Schritt 5'-Primersequenzen festgelegt und synthetisiert werden, die im untranslatierten Bereich des jeweiligen Gens liegen. Da die Intronsequenzen sämtlicher J-Minigene bekannt und über Genbanken zugänglich sind, konnten hieraus ferner 3'-Primersequenzen abgeleitet werden, die im nicht-kodierenden Bereich der DNA der Mausmyelomhybridlinie liegen. Auf diese Weise war es möglich, diese genomische DNA nach PCR-Amplifikation gerichtet zu klonieren, ohne die originale Genstruktur (5'-UTR — Exon 1 — Intron — Exon 2 — J-Intron) zu verändern.

Um vollständige Sequenzen zu erhalten, wurden die V_{LJ}- bzw. V_{HDJ}-PCR-Produkte dann zunächst in geeignete Sequenzierungsvektoren kloniert und die "Insert"-Bereiche von jeweils drei Klonen vollständig sequenziert. Parallel hierzu wurden die PCR-Produkte als Referenz direkt sequenziert. Nach Überprüfung des korrekten Leserahmens und des Nichtvorhandenseins von Stop-Codons innerhalb der klonierten DNA wurde jeweils ein zu den PCR-Produkten sequenzhomologer Klon in die entsprechenden Expressionsvektoren (pUHW₁ bzw. pUHW₂) umkloniert. Diese Vektoren enthielten die für die konstanten Teile eines humanen Antikörpers kodierenden Sequenzen, ein murin/humanes Intronybrid, einen Selektionsmarker, sowie die zur effizienten Expression notwendigen Maus-Promotor- und Enhancerelemente.

Nach Linearisierung der Plasmide wurde eine Kotransfektion beider Konstrukte in Sp2/0-Ag14-Zellen (M. Shulman et al., Nature, 276, S. 269—270, 1978) durchgeführt. Diese Zellen haben die Fähigkeit verloren, eigene Immunglobulinketten zu synthetisieren. Stabile Transfektanten wurden darauf durch Geneticin-Selektion isoliert. Die Austestung der Kulturüberstände erfolgte mit der Immunfluoreszenztechnik auf L428KS-Zellen, einer Hodgkinlymphomlinie (V. Diehl et al., "Characteristics of Hodgkin's disease-derived cell lines", Cancer Treatment Reports, 66, S. 615—632, 1982). Mehrere positive Primärkulturen wurden gefunden und jeweils kloniert und rekloniert. Zur Spezifitätsabklärung des sezernierten Antikörpers wurde untersucht, ob das Reaktionsspektrum des chimären Proteins dem des murinen mAk Ber-H2 entsprach. Sowohl ein Panel von CD30⁺- bzw. CD30⁻-Zelllinien in der Immunfluoreszenz als auch die immunhistologische Austestung an humanem Morbus Hodgkin-Gewebe ergaben, daß das chimärisierte Reagenz eine mit dem ursprünglichen Maus-Antikörper Ber-H2 vergleichbare Spezifität aufweist.

Der Vorteil der hier dargelegten erfundungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. ihrer Produkte gegenüber dem Stand der Technik besteht zum einen in der weit geringeren Immunogenität im menschlichen Körper und zum anderen in deren vielfältigen Manipulationsmöglichkeiten, die sich aufgrund der Kenntnis der DNA-Sequenzen ergeben. So ist es z. B. möglich, ein Protein mit CD30-Spezifität in Bakterien oder Insektenzellen mit viel niedrigeren Kosten herzustellen, als in der konventionellen Zellkultur. Die Kenntnis der Sequenzen ermöglicht auch die Kopplung mit anderen DNA-Sequenzen, die für aktivierende oder toxische Proteine, Enzyme oder Liganden von Abwehrzellen kodieren. Ferner können Fragmente der Gesamtsequenzen wie z. B. isolierte



hypervariable Regionen für die Synthese entsprechender Proteinfragmente eingesetzt werden.
Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen veranschaulicht.

Beispiel 1

5

Isolierung von Nukleinsäuren aus Myelomhybridzellen

Etwa 2×10^8 Zellen der Mausmyelomhybridlinie Ber-H2 wurden mittels Zentrifugation pelletiert, in 100 µl PBS resuspendiert und in 4 ml GT-Puffer (enthaltend 4 M Guanidiniumisothiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, 0,5% Natriumlaurylsarcosin, 100 mM β -Mercaptoethanol, pH-Wert 7,0) lysiert. Die erhaltene Suspension wurde auf einen Cäsiumchlorid-Gradienten geladen, welcher 2 ml 5,7 M Cäsiumchlorid, 1,5 ml 40% (Gew./Vol.) CsCl, 1,5 ml 30% (Gew./Vol.) CsCl und 1 ml 20% (Gew./Vol.) CsCl enthielt. Nach einer 20 Stunden langen Zentrifugation mit 35 000 UpM bei 15°C wurde die pelleteierte cytoplasmatische RNA gewonnen, in destilliertem Wasser gelöst, durch PIC-Extraktion (50 Vol.-% Phenol, 48 Vol.-% CHCl₃, 2 Vol.-% Isoamylalkohol) aufgereinigt und mit Ethanol gefällt. Die Präzipitate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

10

15

Beispiel 2

20

cDNA-Synthese

25

Ein etwa 100 µg RNA entsprechendes Volumen des gemäß Beispiel 1 erhaltenen Präzipitats wurde zur cDNA-Synthese eingesetzt. Das Präzipitat wurde 15 Minuten lang bei 4°C mit 14 000 UpM zentrifugiert, mit 300 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, und die RNA wurde in 15 µl H₂O gelöst. Nachfolgend wurde der Ansatz 20 Minuten lang bei 45°C mit 375 µl DMSO denaturiert, mit Ethanol gefällt und nach 15 Minuten langer Zentrifugation bei 4°C und 14 000 UpM und nach Waschung mit 70% Ethanol in 5 x RT-Puffer gelöst.

30

Der Reaktionsansatz für die Reverse Transkriptase enthielt je 1 mM der vier dNTP's, 1 µg c_x- bzw. c_y-Primer, 1000 Einheiten MMLV-Reverse Transkriptase (BRL), 20 µCi [³²P]dCTP, 2 Einheiten RNase Block 2 (Stratagene) und H₂O bis zu einem Endvolumen von 100 µl. Der Ansatz wurde 90 Minuten lang bei 37°C inkubiert und anschließend wurde die RNA 30 Minuten lang bei 42°C mit 50 µg RNase behandelt. Nach PIC-Extraktion, Fällung, Zentrifugation und Waschen der cDNA gemäß Beispiel 1 wurde der Niederschlag in 8 µl H₂O gelöst, mit 8 µl denaturierendem Laupuffer vermischt und auf ein Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetragen und 2 Stunden lang bei 54°C und 2500 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 12 Stunden lang bei -80°C auf einem Röntgenfilm exponiert. Die im Autoradiogramm den V_L- bzw. V_HDJ-Fragmenten entsprechenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit 500 µl NH₄OAc bei 37°C eluiert. Die Eluate wurden anschließend mit Ethanol gefällt und nach Zentrifugation und Waschen der DNA gemäß Beispiel 1 in 10 µl H₂O gelöst.

35

Der Ansatz für die anschließende "Tailing"-Reaktion der cDNA enthielt 1 mM dGTP, 100 mM Na-Cacodylat, 1 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM CoCl₂, 2 µg BSA, 33 Einheiten terminale Desoxynukleotidyltransferase (BRL), 5 µl cDNA und Wasser bis zu einem Endvolumen von 20 µl. Die Reaktion wurde 60 Minuten lang bei 37°C durchgeführt. Nach PIC-Extraktion, Ethanolfällung und Waschen der Nukleinsäure gemäß Beispiel 1 wurde die erhaltene DNA nach Lösen in 20 µl Wasser und Herstellung einer Verdünnungsreihe dem anschließenden PCR-Verfahren zugeführt.

40

45

Beispiel 3

45

PCR-Verfahren

50

Die DNA aus Beispiel 2 wurde mit Hilfe eines Poly-C-Anker-Primers (AN-Poly-C) sowie des entsprechenden 3'c-Primers (konL1 bzw. konH1) in einer ersten PCR-Reaktion amplifiziert, wobei sich der Buchstabe c auf den konstanten Bereich bezieht. Der Reaktionsansatz enthielt 10 ng des Primers AN-Poly-C-Oligo, 100 ng Ankerprimer, 100 ng konL1- bzw. konH1-Oligo, 2 µl 10 x PCR-Puffer (2 mM dNTP's, 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH-Wert 8,4), 2 Einheiten Taq-Polymerase, 5 µl cDNA und Wasser bis zu einem Endvolumen von 20 µl. Die Reaktion erfolgte nach dem folgenden PCR-Programm: 5 Minuten 94°C, 5 Zyklen von jeweils 1 Minute 94°C, 2 Minuten 42°C, 1 Minute 72°C, 30 Zyklen von jeweils 1 Minute 94°C, 1 Minute 42°C, 1 Minute 72°C und 10 Minuten 72°C.

55

Die auf diese Weise erhaltenen DNA-Moleküle wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die mit V_x bzw. V_y korrespondierenden Banden wurden ausgeschnitten und in 100 µl H₂O 12 Stunden lang bei 4°C eluiert. Anschließend erfolgte eine zweite PCR-Reaktion mit einer Verdünnungsreihe der aus dem Gel eluierten DNA wie oben beschrieben, jedoch mit der Abweichung, daß 3'c-Primer (konL2 bzw. konH2) eingesetzt wurden, die Restriktionsschnittstellen-Überhänge an den 5'-Enden aufwiesen.

60

Beispiel 4

65

Klonierung der cDNA

Zunächst wurde sowohl der Vektor pGEM®-11Zf(+) (Promega, Heidelberg) als auch die erhaltene cDNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SalI 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach Dephosphorylierung des Plasmids mit 2 x 4 Einheiten Kälberdarm-Phosphatase (20 Minuten 37°C, 10 Minuten 70°C) wurden Vektor



und cDNA auf einem Agarose- bzw. Polyacrylamidgel aufgetrennt, anschließend auf eine NA-45-Membran (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert und 30 Minuten lang bei 65°C mit 1M NaCl in 1 x TE eluiert. Die Eluate wurden gemäß Beispiel 1 mit Ethanol gefällt, zentrifugiert, gewaschen und in H₂O gelöst. Die anschließende Ligationsreaktion erfolgte 12 Stunden lang bei 16°C, wobei der Ansatz 2 Einheiten T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Boston, USA), 1 mM ATP und 5 x Ligasepuffer enthielt und das molare Verhältnis von Plasmid zu cDNA 1 : 2 betrug. Der Ligationsansatz wurde anschließend zur Transformation kompetenter E. coli-Bakterien (XL 1 blue) mit 200 µl Bakteriensuspension vermischt und zunächst 30 Minuten lang bei 0°C, dann 2 Minuten lang bei 42°C, dann 5 Minuten lang bei 0°C und schließlich nach Zugabe von 1 ml LB-Medium 1 Stunde lang bei 37°C im Schüttler inkubiert. Jeweils 200 µl des Ansatzes wurden auf antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die entstandenen Einzelkolonien wurden nun in LB-Ampicillin-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Mit der auf diese Weise erhaltenen Bakterienkultur wurde sodann eine Plasmidpräparation durchgeführt und der Klonierungserfolg wurde nach Restriktionsverdau und anschließendem Auftragen des Ansatzes auf ein Agarosegel überprüft. Die positiven Klone wurden anschließend zur Sequenzierung 30 Minuten lang bei 37°C mit 0,2N NaOH alkalisch denaturiert. Nach Ethanolfällung, Zentrifugation und Waschen des Niederschlags gemäß Beispiel 1 wurde die DNA gelöst und ein Aliquot zur Mengenabschätzung auf ein Agarosegel geladen.

Beispiel 5

Sequenzierung der DNA-Fragmente

Die Sequenzierung der klonierten cDNA sowie der genomischen DNA erfolgte nach der Methode von Sanger (F. Sanger, S. Nicklen und A. R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74 : 546 (1977)) mit dem Sequenase-Kit-Version 2.0 (United States Biochemical, USA) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Gelektrophoresen erfolgten bei 54°C und einer Spannung von 1500 V.

Mit Hilfe der cDNA-Sequenzen wurden in einem zweiten Schritt Primersequenzen festgelegt und synthetisiert, um die genomische DNA zu amplifizieren. Hierbei wurden die nachfolgend angegebenen 5'-Oligonukleotide

30 5' GATCGTCGACGGAAATGCATCAGACCAGCATGGGC 3' (LCHTUKup)
bzw.

35 5' CATAGTCGACAATACTGATCAGCATCCTCTCCACAG 3' (HACHBERup)

so gewählt, daß sie im Bereich der 5'-untranslatierten Regionen binden. Die 3'-Primer

40 5' ATCAGCGGCCGCACTTAACAAGGTTAGACTTAGTGAAC 3' (LCHTUKdo)
bzw.

5' GATAGCGGCCGCATGCATTAGAATGGGAGAAGTTAGG 3' (HACHBERdo)

45 wurden anhand der Information über das jeweils rekombinierte J-Minigen im entsprechend zugehörigen invarianten J-Intron ausgewählt. Die Primer enthielten außerdem die zur Klonierung in Expressionsvektoren notwendigen Restriktionsschnittstellen. Die genomische DNA wurde mit Hilfe dieser Primer amplifiziert. Die PCR-Reaktion (5 µl 10 x PCR-Puffer (1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, 500 µM KCl, 100 µM Tris-HCl, pH-Wert 8,3), 2,5 Einheiten Taq-Polymerase (Perkin Elmer, Überlingen), je 5 µM Primer, 5 µl genomische DNA einer Verdilnungsreihe, ad 50 µl H₂O) wurde mit folgendem Programm durchgeführt: 5 Minuten 95°C, 26 Zyklen von jeweils 1 Minute 94°C, 2 Minuten 55°C, 2 Minuten 72°C, 7 Minuten 72°C.

55 Um vollständige Sequenzen zu erhalten, wurden die VJ- bzw. VDJ-PCR-Produkte zunächst in Sequenzierungsvektoren kloniert (pGEM®-5Zf(+), Promega, Heidelberg) und jeweils 3 Klone vollständig (nach Beispiel 5) sequenziert. Parallel hierzu wurde das PCR-Produkt als Referenz direkt sequenziert (Cycle-Sequencing-Kit, Perkin Elmer, Überlingen). Nach Überprüfung des korrekten Leserahmens und des Nichtvorhandenseins von Stop-Codons innerhalb der klonierten DNA wurde jeweils ein zum PCR-Produkt sequenzhomologer Klon in den entsprechenden Expressionsvektor umkloniert. Diese Vektoren enthielten die für die konstanten Teile eines humanen Antikörpers kodierenden Sequenzen, ein murin-humanenes Intronhybrid, einen Selektionsmarker sowie die zur Expression notwendigen Maus-Promotor- und Enhancerelemente.

Beispiel 6

Umklonierung in Expressionsvektor und Expression des chimären Proteins

65 Zur Umklonierung wurden sowohl von den pGEM®-5-Konstrukten gemäß Beispiel 5 als auch von den Expressionsvektoren pUHW_K bzw. pUHW_{Y1} (W. Weissenhorn et al., Gene, 106, S. 273–277, 1991) je ca. 1 µg DNA mit den Restriktionsenzymen SalI und NotI geschnitten. Nach der Restriktion wurde der Ansatz auf ein



Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden, die dem VJ-bzw. VDJ-Gen entsprachen, wurden gemäß Beispiel 4 aus dem Gel isoliert. Der Restriktionsverdau, die Aufreinigung und Dephosphorylierung der Vektoren, die Ligation und Transformation sowie die Anzucht der Bakterienkultur erfolgte ebenfalls gemäß Beispiel 4. Nach Plasmidaufarbeitung und Restriktionsverdau wurde von je einem positiven Klon eine 100 ml umfassende Bakterienkultur bei 37°C angezogen. Die zur Transfektion benötigte Plasmid-DNA wurde mit dem Quiagen-Plasmid-Midi-Kit (Quiagen GmbH, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers aus den Bakterien isoliert und aufgereinigt.

Die vorbereiteten Plasmide für leichte und schwere Ketten wurden zur stabilen Transfektion mit den Restriktionsenzymen EcoRI bzw. PvuI linearisiert, gereinigt, und zur Mengenabschätzung wurde ein Aliquot auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Transfektion erfolgte unter Anwendung des Gene-Pulser-Geräts (Biorad, München): jeweils ca. 4 µg Plasmid und 1×10^6 Sp2/0-Maus-Myelomhybrid-Zellen wurden in 1 x HeBS (20 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5mM KCl, 700 mM Na₂HPO₄, pH-Wert 7,5) mit 940 µF und 270 V. gepulst, bevor die Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml in Dulbecco's Modified Eagle's Medium unter Zusatz von 10% foetalem Kälberserum ausgesät wurden. Für die Selektion positiver Klone wurde dem Medium 48 Stunden nach der Aussaat das Antibiotikum G418 in einer Konzentration von zunächst 800 µg/ml zugegeben, wobei die Konzentration allerdings nach 12 Tagen auf 1200 µg/ml erhöht wurde. Nach 15 Tagen konnten Primärkulturen, deren Kulturüberstände mit L428KS-Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz reagierten, identifiziert werden. Diese Transfektanten wurden kloniert, rekloniert und Überstände mit Hilfe eines Durchflusscytometers wiederum auf L428KS-Zellen analysiert. Einzelne Überstände wurden auch gegenüber CD30-negativen Zellen, z. B. der Zelllinie KG-1, untersucht, eine Reaktion konnte erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

5

(i) ANMELDER:

10

- (A) NAME: medac Gesellschaft fuer klinische Spezialpraeparate mbH
- (B) STRASSE: Fehlandstrasse 3
- (C) ORT: Hamburg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 20312

15

(ii) ANMELDETITEL: Rekombinante Liganden fuer das menschliche Zellmembran-Antigen CD30

20

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

25

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

25

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

30

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

35

- (A) LÄNGE: 470 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

45

(ix) MERKMALE:

45

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..47

50

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 48..>470

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Primaerprodukt der schweren gammal-Kette von BerH2"

55

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
- (B) LAGE: 48..101

60

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE: 102..>470

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Schwere gammal-Kette von BerH2"

65

X

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 102..470
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region der schweren gamma1-Kette von BerH2" 5

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 192..206
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR1 von BerH2" 10

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 249..299
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR2 von BerH2" 15

(ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 396..437
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR3 von BerH2" 20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1: 30

AATAACGATCA GCATCCTCTC CACAGACACT GAAAACCTCTG ACTCACAA ATG GAA GGC Met Glu Gly -18	56
ACT GGA TCT TCT CCT GTT TTC AGT ACT GCA GGT GTC CAC TCC CAG Thr Gly Ser Ser Leu Pro Val Phe Ser Thr Ala Gly Val His Ser Gln -15 -10 -5 1	104
GTC CAG CTT CAC GAG TCT GGG GCT GAA GTG GCA AAA CCT GGG GCC TCA Val Gln Leu His Glu Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala Ser 5 10 15	152
GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT ACC TAC TGG Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Trp 20 25 30	200
ATG CAC TGG ATA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly 35 40 45	248
TAC ATT AAT CCT AGC ACT GGT TAT ACT GAC TAC AAT CAG AAC TTC AAG Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys 50 55 60 65	296
GAC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGA ACA GCC TAC ATG Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Arg Thr Ala Tyr Met 70 75 80	344



CAA CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT ACA GTC TAT TAC TGT ACA Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Thr Val Tyr Tyr Cys Thr 85 90 95	392
5 AGA AGG GGA CCC TCG TAT GGT AAC CAC GGG GCC TGG TTT CCT TAC TGG Arg Arg Gly Pro Ser Tyr Gly Asn His Gly Ala Trp Phe Pro Tyr Trp 100 105 110	440
10 GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 115 120	470

15

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

20 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 141 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

30 Met Glu Gly Thr Gly Ser Ser Leu Pro Val Phe Ser Thr Ala Gly Val -18 -15 -10 -5
His Ser Gln Val Gln Leu His Glu Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro 1 5 10
35 Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr 15 20 25 30
40 Thr Tyr Trp Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu 35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln 50 55 60
45 Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Arg Thr 65 70 75
50 Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Thr Val Tyr 80 85 90
Tyr Cys Thr Arg Arg Gly Pro Ser Tyr Gly Asn His Gly Ala Trp Phe 95 100 105 110
55 Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 115 120

60

65



(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:	
(A) LÄNGE: 598 Basenpaare	5
(B) ART: Nukleinsäure	
(C) STRANGFORM: Doppel	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)	10
(ix) MERKMALE:	
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature	15
(B) LAGE: 1..6	
(D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Restriktionsschnittstelle SalI, synthetisch"	
(ix) MERKMALE:	20
(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR	
(B) LAGE: 7..53	
(ix) MERKMALE:	25
(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon	
(B) LAGE: 54..98	
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= Exon1	
(ix) MERKMALE:	30
(A) NAME/SCHLÜSSEL: intron	
(B) LAGE: 99..179	
(ix) MERKMALE:	35
(A) NAME/SCHLÜSSEL: exon	
(B) LAGE: 180..557	
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= Exon2	
(ix) MERKMALE:	40
(A) NAME/SCHLÜSSEL: intron	
(B) LAGE: 558..>590	
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= J3-Intron	
(ix) MERKMALE:	45
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS	
(B) LAGE: join(54..98, 180..557)	
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Prim.prod. d. var. Region d. schweren gammal-Kette v. Berk2"	50
(ix) MERKMALE:	55
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature	
(B) LAGE: 498..>590	
(D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "J3-Minigen"	
	60
	65



- 5 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 591..598
(D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Restriktionsschnittstelle
NotI, synthetisch"

10 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
(B) LAGE: join(54..98, 180..188)

15 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE: 189..557
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region der
schweren gamma1-Kette von BerH2"

20 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 279..293
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CD1 von
BerH2"

25 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 336..386
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR2 von
BerH2"

30 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 483..524
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR3 von
BerH2"

35 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 483..524
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR3 von
BerH2"

40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GTCGACAATA CGATCAGCAT CCTCTCCACA GACACTGAAA ACTCTGACTC ACA ATG Glu Gly Thr Gly Ser Ser Leu Pro Val Phe Ser Thr Ala Gly	56 Met -18
	98
	.
TAGGGGCTCA CCAGTTCAAA ATCTGAAGAG GAAACAGAAT CTGAGGTGAC AGTGATACCT	158
ACTATCCTTC TGTCCACAGG T GTC CAC TCC CAG GTC CAG CTT CAC GAG TCT Val His Ser Gln Val Gln Leu His Glu Ser	209
	-3 1 5
GGG GCT GAA GTG GCA AAA CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys	257
	10 15 20



DE 195 43 039 C1

GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT ACC TAC TGG ATG CAC TGG ATA AAA CAG Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Trp Met His Trp Ile Lys Gln 25 30 35	305
AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC ATT AAT CCT AGC ACT Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr 40 45 50 55	353 5
GGT TAT ACT GAC TAC AAT CAG AAC TTC AAG GAC AAG GCC ACA TTG ACT Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr 60 65 70	401 10
GCA GAC AAA TCC TCC AGA ACA GCC TAC ATG CAA CTG AGC AGC CTG ACA Ala Asp Lys Ser Ser Arg Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr 75 80 85	449 15
TCT GAG GAC TCT ACA GTC TAT TAC TGT ACA AGA AGG GGA CCC TCG TAT Ser Glu Asp Ser Thr Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Gly Pro Ser Tyr 90 95 100	497 20
GGT AAC CAC GGG GCC TGG TTT CCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC Gly Asn His Gly Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val 105 110 115	545 25
ACT GTC TCT GCA GGTGAGTCCT AACTTCTCCC ATTCTAAATG CATGCGGCCG Thr Val Ser Ala 120	597 30
C	598
	35
	40
	45
	50
	55
	60
	65



(2) INFORMATION ZU SEQ ID NÖ: 4:

- 5 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 412 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Doppel
(D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

- 15 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
(B) LAGE: 1..4

- 20 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 5..412
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Primaerprodukt der
Leichten kappa-Kette von BerH2"

- 25 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
(B) LAGE: 5..91

- 30 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE: 92..>412
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Leichte kappa-Kette von
BerH2"

- 35 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 92..412
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region der
leichten kappa-Kette von BerH2"

45

50

55

60

65



(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 161..193
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Variable Region CDR1 von BerH2"

5

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 239..259
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Variable Region CDR2 von BerH2"

10

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 356..382
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Variable Region CDR3 von BerH2"

15

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4 :

GGAA ATG CAT CAG ACC AGC ATG GGC ATC AAG ATG GAA TCA CAG ACT CTG
 Met His Gln Thr Ser Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Thr Leu
 -29 -25 -20 -15

49

25

GTC TTC ATA TCC ATA CTG CTC TGG TTA TAT GGT GCT GAT GGG AAC ATT
 Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr Gly Ala Asp Gly Asn Ile
 -10 -5 1

97

30

GTA ATG ACC CAA TCT CCC AGA TCC ATG TCC ATG TCT GTA GGA GAG AGG
 Val Met Thr Gln Ser Pro Arg Ser Met Ser Met Val Gly Glu Arg
 5 10 15

145

35

GTC ACC TTG AGC TGC AAG GCC AGT GAG AAT GTG GAT ACT TAT GTA TCC
 Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr Val Ser
 20 25 30

193

40

TGG TAT CAA CAG AAA CCA GAG CAG TCT CCT AAA CTC CTG ATA TAC GGG
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly
 35 40 45 50

241

45

GCA TCC AAC CGG TAC ACT GGG GTC CCC GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA
 Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 55 60 65

289

50

TCT GCA ACA GAT TTC ACT CTG ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA GAC
 Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp
 70 75 80

337

55

CTT GCA GAT TAT CAC TGT GGA CAG AGT TAC AGA TAT CCT CCC ACG TTC
 Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Arg Tyr Pro Pro Thr Phe
 85 90 95

385

55

GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

412

60

65



(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 136 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met His Gln Thr Ser Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Thr Leu Val
 -29 -25 . -20 -15

Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp⁻¹Leu Tyr Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val
-10 -5 1

Met Thr Gln Ser Pro Arg Ser Met Ser Met Ser Val Gly Glu Arg Val
5 10 15

Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr Val Ser Trp
20 25 30 35

Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala
40 45 50

Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
55 60 65

Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gin Ala Glu Asp Leu
70 75 80

Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Arg Tyr Pro Pro Thr Phe Gly
85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

(2) INFORMATION ZU SEO ID NO: 6 :

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

 - (A) LÄNGE: 777 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Doppel
 - (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
(B) LAGE: 1..6
(D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Restriktionsschnittstelle
Sali, synthetisch"



- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
 (B) LAGE: 7..10 5
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
 (B) LAGE: 11..85
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= Exon1 10
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: intron
 (B) LAGE: 86..374 15
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
 (B) LAGE: 375..707
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= Exon2 20
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: intron
 (B) LAGE: 708..777
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= J2-Intron 25
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: join(11..85, 375..707)
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Prim.prod. d. var.
 Region d. leichten kappa-Kette v. BerH2" 30
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 674..>777
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "J2-Minigen" 35
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
 (B) LAGE: join(11..85, 375..386) 40
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE: 387..>707
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region der
 leichten kappa-Kette von BerH2" 45
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 456..488
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR1 von
 BerH2" 50
- (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
 (B) LAGE: 534..554
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR2 von
 BerH2" 55
- 60



(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature

(B) LAGE: 651..677

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR3 von BerH2"

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6 :

	GTCGACGGAA ATG CAT CAG ACC AGC ATG GGC ATC AAG ATG GAA TCA CAG Met His Gln Thr Ser Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln -29 -25 -20	49
10		
15	ACT CTG GTC TTC ATA TCC ATA-CTG CTC TGG TTA TAT GGTAAAACAT Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr -15 -10 -5	95
20		
25	TTAAAAGTAC TATAATATCT TAAAATAATT AATTTGTAGA GAAATAGCTA TTTCTATAG GATGCCAATA GCATGCAGAC AATGCAATTAA GAAAAGTTAT TTTAAAATCT AAAATCTTGC TGGCATATCG ATGGTGACTG CGTTGGAGG CTGATTTTG GATGGATCCC CCCCCCAAAA AAAGAAAAGA AAAGTTATTT TAGATTCAA CGATTATGTA ATGAAGTCTT TTGTGTGTGT	155 215 275 335
30	GTGTGTGTAT ATATATATAT ACTCATTGTT CTGATTCA GGT GCT GAT GGG AAC Gly Ala Asp Gly Asn -4 1	389
35	ATT GTA ATG ACC CAA TCT CCC AGA TCC ATG TCC ATG TCT GTA GGA GAG Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Arg Ser Met Ser Met Ser Val Gly Glu 5 10 15	437
40	AGG GTC ACC TTG AGC TGC AAG GCC AGT GAG AAT GTG GAT ACT TAT GTA Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr Val 20 25 30	485
45	TCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GAG CAG TCT CCT AAA CTC CTG ATA TAC Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr 35 40 45	533
50	GGG GCA TCC AAC CGG TAC ACT GGG GTC CCC GAT CGC TTC ACA GGC AGT Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser 50 55 60 65	581
55	GGA TCT GCA ACA GAT TTC ACT CTG ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu 70 75 80	629
60	GAC CTT GCA GAT TAT CAC TGT GGA CAG AGT TAC AGA TAT CCT CCC ACG Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Arg Tyr Pro Pro Thr 85 90 95	677
65	TTC GGA GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGTAAGTAGT CTTCTCAATT Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105	727
70	TTGTTCACTA AGTCTAACCT TGTTAAGTGC GGCCGCACTA GTGATATCCC	777



Patentansprüche

1. Rekombinante DNA-Moleküle, welche für variable Immunglobulinketten oder Fragmente derselben kodieren, die Spezifität für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 aufweisen, wobei die rekombinanten DNA-Moleküle Sequenzen gemäß einer oder mehrerer der SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und/oder 6 oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben umfassen, und wobei die SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und 6 Bestandteil dieses Anspruchs sind. 5
2. Rekombinante DNA-Moleküle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie jeweils einen oder mehrere der hypervariablen Bereiche der in den SEQ ID NOS: 1 oder 3 bzw. in den SEQ ID NOS: 4 oder 6 angegebenen Sequenzen oder syngene oder allelische Varianten derselben umfassen, wobei die SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und 6 Bestandteil dieses Anspruchs sind. 10
3. Rekombinante DNA-Moleküle nach den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß dies Sequenzen gemäß einer oder mehrerer der SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und/oder 6 oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben operativ miteinander verknüpft sind, wobei die SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und 6 Bestandteil dieses Anspruchs sind. 15
4. Rekombinante DNA-Moleküle nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenzen gemäß einer oder mehrerer der SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und/oder 6 oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben operativ mit DNA-Sequenzen verknüpft sind, die für konstante Teile eines humanen oder tierischen Immunglobulinmoleküls kodieren, wobei die SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und 6 Bestandteil dieses Anspruchs sind. 20
5. Rekombinante DNA-Moleküle nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die in den SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und/oder 6 angegebenen Sequenzen oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben operativ mit DNA-Sequenzen verknüpft sind, die für toxische Proteine oder Enzyme kodieren, wobei die SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und 6 Bestandteil dieses Anspruchs sind. 25
6. Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er ein oder mehrere der rekombinanten DNA-Moleküle nach den Ansprüchen 1 bis 5, operativ verknüpft mit Expressionskontroll-Sequenzen, enthält.
7. Expressionsvektor nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß er für die Expression in einer Prokaryonten-Wirtszelle geeignet ist.
8. Expressionsvektor nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß er für die Expression in einer Eukaryonten-Wirtszelle geeignet ist. 30
9. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem der Vektoren nach den Ansprüchen 6 bis 8 transformiert ist.
10. Wirtszelle nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Prokaryonten-Zelle ist.
11. Wirtszelle nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Eukaryonten-Zelle ist.
12. Wirtszelle nach Anspruch 11 mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2224. 35
13. Verfahren zur Herstellung von Liganden für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30, dadurch gekennzeichnet, daß man eine der Wirtszellen nach den Ansprüchen 9 bis 12 in einem geeigneten Nährmedium kultiviert, anschließend die Zellen von dem Medium abtrennt und die Liganden als Expressionsprodukte aus dem Medium oder aus dem Cytoplasma der Wirtszellen isoliert.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man die Liganden anschließend reinigt und mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen zu pharmazeutischen oder diagnostischen Präparaten formuliert. 40
15. Rekombinante Liganden für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens die in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen oder Fragmente oder allelische Varianten derselben umfassen, wobei die SEQ ID NOS: 2 und 5 Bestandteil dieses Anspruchs sind. 45
16. Rekombinante Liganden nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie jeweils einen oder mehrere der hypervariablen CDR-Bereiche der in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen oder syngene oder allelische Varianten derselben umfassen, wobei die SEQ ID NOS: 2 und 5 Bestandteil dieses Anspruchs sind.
17. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebene Aminosäuresequenzen oder Fragmente oder allelische Varianten derselben untereinander verknüpft sind, wobei die SEQ ID NOS: 2 und 5 Bestandteil dieses Anspruchs sind. 50
18. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebene Aminosäuresequenzen oder Fragmente oder allelische Varianten derselben mit konstanten Teilen eines humanen oder tierischen Immunglobulinmoleküls verknüpft sind, wobei die SEQ ID NOS: 2 und 5 Bestandteil dieses Anspruchs sind. 55
19. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie peptidisch oder über Linker-Moleküle mit toxischen Proteinen oder mit Enzymen bzw. Proenzymen verknüpft sind.
20. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit Toxinen in Form von Ribosomenaktivierenden Proteinen verknüpft sind. 60
21. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit Enzymen aus der Gruppe der Phosphodiesterasen verknüpft sind.
22. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie direkt oder über Linker-Moleküle kovalent oder konjugiert mit radioaktiven Isotopen verknüpft sind.
23. Rekombinante Liganden nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die radioaktiven Isotope aus der Gruppe bestehend aus Indium, Jod, Yttrium, Technetium, Rhenium, Kupfer und Lutetium ausgewählt sind. 65
24. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie direkt oder



über Linker-Moleküle kovalent oder konjugiert mit photoaktivierbaren Verbindungen verknüpft sind.
25. Diagnostische oder pharmazeutische Präparate, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen oder mehrere der Liganden nach den Ansprüchen 15 bis 24 allein oder in Kombination mit üblichen Trägerstoffen und Verdünnungsmitteln enthalten.

5 26. Diagnostische oder pharmazeutische Präparate, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen oder mehrere Liganden hergestellt nach dem Verfahren gemäß den Ansprüchen 13 oder 14 allein oder in Kombination mit üblichen Trägerstoffen und Verdünnungsmitteln enthalten.

27. Verwendung der Präparate nach den Ansprüchen 25 oder 26 zur Diagnostik und/oder Behandlung von Krebsformen, bei denen das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 gebildet wird.

10 28. Verwendung der Präparate nach Anspruch 27 zur Diagnose und/oder Behandlung der Hodgkinschen Erkrankung.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

